

TRANSLATION CERTIFICATION

We, **AD-EX WORLDWIDE**, an industrial translation service founded in 1957, domiciled at 525 Middlefield Road, Suite 150, Menlo Park, California 94025-3458, USA, do hereby certify that:

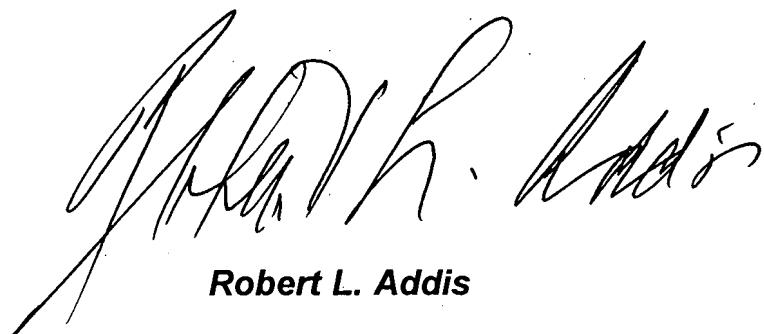
- we are internationally recognized professional translators from Japanese into English;
- we have been serving the public in that capacity since 1957;
- the attached 20-page English text, each of whose pages is identified by JP(A)59-93100, is a translation from Japanese to English entirely performed by us;
- said English translation from Japanese constitutes a complete and accurate description of the entire meaning of the printed portions of the original Japanese-language text identified as

Japanese Patent Application Public Disclosure No. 59-93100
(a 9-page document with pages numbered from 1189 to 1197)

of which a copy is appended to this English translation.

So declared with such exceptions as may be indicated in the translation.

Thus certified for and on behalf of **AD-EX Worldwide** by its Certifying Officer:



Robert L. Addis

日本国特許
公開特許公報(A)

特許出願公開
昭59-93100

Int. Cl.
C 07 H 21 02
21 04

海別記号

内空整理番号
7252-4C
7252-4C

公開 昭和59年(1984)5月29日
登記の式
審査請求 未請求

(全 9 頁)

オリゴスクレオチド誘導体およびその製造法

特
願 昭58-204306
出
願 昭57(1982)8月9日
特
願 昭57-138136の分割
發
明
者 三好健一
広島県高田郡吉田町吉田1366-1

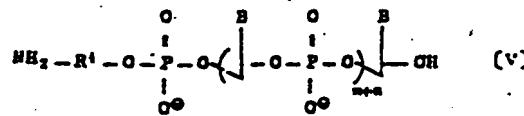
發
明
者 不詳
広島市中区小町6-17-602
出
願
人 沖永製薬株式会社
大阪市福島区福島三丁目1番39
号
代
理
人 弁理士 有田清
外2名

明細書

1. 発明の名称 オリゴスクレオチド誘導体およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 下式(V)で示されるものであることを特徴とする、オリゴスクレオチド誘導体。



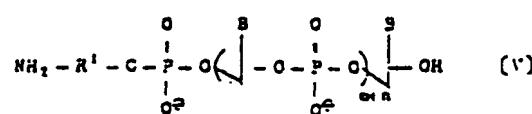
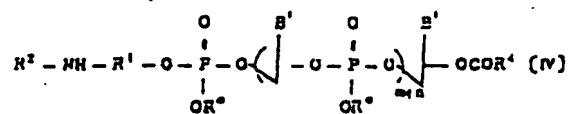
〔ただし、 α および β はそれぞれ0または任意の自然数であり、 R^1 は二価の酸または分岐鎖の炭化水素基であり、Bにスクレオチドを構成する基である(、Bが環式酸存在するときに、それらに同一でも異なってもよい)。〕

2. 由基Bがアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より成ばれものである。特許請求の範囲1項記載のオリゴスクレオチド誘導体。

3. R^1 が炭素数2~20の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲1項または第2項記載のオリゴスクレオチド誘導体。

4. α が0または6までの自然数、 β が0または40までの自然数である、特許請求の範囲1~3項のいずれか1項に記載のオリゴスクレオチド誘導体。

5. 下式(W)で示される化合物の5'-末端基上にアミノ基の保護基 R^2 、3'-末端の $OCOR^4$ 基、由基部分およびリン酸部分の保護基をすべて除去することを特徴とする、下式(V)で示されるオリゴスクレオチド誘導体の製造法。



〔ただし、 α および β はそれぞれ0または任意の自然数であり、 R^2 にリン酸基を保護する所

-1189-
会津製薬株式会社

基で合成するための方法であり、R¹は二価の酸性または無酸性の炭化水素酸基であり、R²はアミノ基の保護基であり、CCR¹基はスクレオチドの3'-末端水酸基の保護基であり、R³はスクレオチドを形成する保護された構基であって必要に応じて保護されたものであり、R⁴はスクレオチドを形成する構基である(R⁴またはR⁵が複数個存在するときに、それらは同一でも等なってよい)。]

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

技術分野

本発明は、一般に、新規オリゴスクレオチド誘導体に関する。さらに具体的には、本発明は、スクレオチドの5'-末端リン酸基延長上に適度な長さのスペーサーを介して一級アミノ基を導入してなるオリゴスクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このようなオリゴスクレオチド誘導体の製造法にも属する。

工業の研究に多大な寄与をするものである。

本発明前らは現在まで、オリゴスクレオチドの有機化成的合成分野で用慣れた有力な合成手段として、種々のオリゴスクレオチドの合成を行なってその応用を検討してきたが、特にアフィニティクロマトグラフィー用樹脂あるいは非放射性アフィニティプローブ等を用いてよく操作等力を要ねた結果、これらの製造の際に有用な中間体であるオリゴスクレオチド誘導体を見出した。

現在まで同様あるいは市販されているアフィニティクロマトグラフィー用樹脂(Arch. Biochem. Biophys., 168, 561(1974)、J. Biochem., 83, 783(1978)、特願昭52-25795号、同53-101396号、同53-133283号および同55-36277号各公報)や非放射性用アフィニティプローブ(Proc. Natl. Sci. USA, 78, 6633-6637(1981))に用いられているオリゴスクレオチド誘導体は、一般に合併がめんどうであるという共通の難点をかかえている。

本発明はアフィニティ・プローブにおいては、シ

先行技術

近年、技術の化学生物に新しい技術の導入あるいはトリニステル基、ホスファイト基等の新しい結合基の開発により飛躍的に進歩している。また、微粒子工学の急速な進歩とあいまって、核酸の化学生合成がこの分野でも新規な手段をもつようになってきた。例えば人工微粒子を合成し、微粒子合成操作を利用して有用物質の合成が行なわれている(インターフェロン: Nature, 281, 544(1979)、白血球白介インターフェロン: Nature, 287, 411(1980))。また、ハイブリッド化のためのプローブ(Nucl. Acids Res., 9, 879(1981))としてや mRNA あるいは一本鎖 DNA から逆転写あるいは RNA ポリメラーゼによって、二本鎖 DNA を合成する際に必要な酵素 DNA に相補的な DNA 断片(プライマー)として利用(Nucl. Acids Res., 8, 4057(1980))等の応用例もある。

このように、核酸の有機化成的合成手段は、生体から離脱できない特殊な配列をもつオリゴスクレオチドの合成を可能にし、分子生物学、遺伝子

トシン誘導体の合成が可能であり(上記文献より)、任意でかつ定められた組合配列をもつ DNA の合成が可能である等の開拓点がある。また、アフィニティ樹脂合成に際して下記に示す文献のものは、リガンドの合成に手間がかかる等の難点がある。

J. Chromatogr., 97, 33(1974)

Biochem. Biophys. Acta, 304, 231(1973)

Anal. Biochem., 71, 471(1976)

これらの理由によって、上記のプローブや樹脂合成の際に有用なオリゴスクレオチド誘導体の提供が少されているのが現状である。

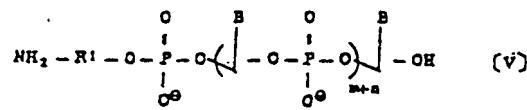
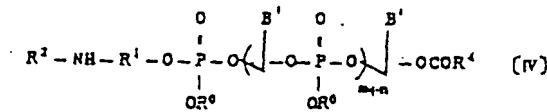
発明の図面

図1

本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、目的物にのみ他の複合を結合できる官能基(一級アミノ基)を、スクレオチドの5'-末端基上に適度の長さのスペーサーを介して導入してなるオリゴスクレオチド誘導体によってこの目的を達成しようというのである。

従って、本発明によるオリゴスクレオナド誘導体に、下式(V)で示されるものであることを特徴とするものである。

また、本発明による下式(V)で示されるオリゴスクレオナド誘導体の構造は、下式(IV)で示される化合物の5'-末端基上のアミノ基の保護基R²、3'-末端のCOR⁴基、核糖部分およびリン酸部分の保護基をすべて除去すること、を特徴とするものである。



[ただし、R²およびR⁴はそれぞれのまたは任意の自然数であり、R³はリン酸基を保護する置換基で通常保護されたフェニル基であり、R¹は二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素基であり、R²はアミノ基の保護基であり、COR⁴基はスクレオナドの3'

段落により選択的にアミノ基部分と結合可能である。

(4) 固相法、液相法およびいかなる方法で合成されたオリゴスクレオナドを固定化することが可能である。

発明の具体的説明

オリゴスクレオナド誘導体(V)

本発明によるオリゴスクレオナド誘導体は、前記の式(V)で示されるものである。

式中、記号B¹は、2'-デオキシリボスクレオナドの5'-および5'-水酸基を除いたデオキシリボスクレオナド誘導基を示すに利用されているものであって、具体的には下記の構造のものである。



記号B²はスクレオナドを形成する基團を示し、通常にアデニン、アミン、シトシンまたはグアニンである。化合物(V)中にB²が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい。

R²およびR⁴は、それぞれのまたは自然数を示す。

本発明の特徴であり、B¹にメクシオナドを形成する保護された基團であって必ずしも同じで保護されたものであり、B²にスクレオナドを形成する基團である(B²またはB¹が保護基またはするとときに、それらは同一でも異なってもよい)。]

効果

本発明の特徴の合成したオリゴデオキシリボスクレオナドは、血漿アフィニティクロマトグラフ、一用樹脂あるいは核酸尾非結合性アフィニティクローブの場所を同定できるものであり、下記のような長所を有するものである。

(1) いかなる塩基配列をも有する上記樹脂やクローブを調達することができる。

(2) 合成が非常に簡単であって、大量合成が可能である。

(3) オリゴスクレオナド中に存在する他の官能基(水酸基、リン酸基および核糖部分のアミノ基など)よりも反応性が高いので、既保護したオリゴスクレオナドを活性化して樹脂との結合に用いることができる。すなわち、反応条件等の

本発明オリゴスクレオナド誘導体の合成度がR²で表示されているのは、本発明の特徴として合成度がそれとR²およびR⁴のフラクションを結合させていることによるものである(詳細後記)。その場合のR²は実用的に0~6、特に1~4、R⁴は実用的に0~40、特に0~20、である。

またR²は化合物(V)のスクレオナド部分の5'-末端リボス基とアミノ基部分とを連結する二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素基である。これは、特に炭素数2~20程度の直鎖または分岐鎖のアルキレン基が適当である。好ましいR²は、炭素数2~6のアルキレン基である。

化合物(V)の合成

一般的説明

化合物(V)、すなわち本発明によるオリゴスクレオナド誘導体は、合目的的な反応の方法によつて合応することができる。

一つの特徴的な方法に、前記の式(IV)のオリゴスクレオナド誘導体、すなわちオリゴデオキシリボスクレオナドの5'-末端リボス基にR²を介して保

特開昭59- 93100(4)

離された一級アミノ基を導入し、スクレオチドの塩基部分およびリン酸基部分が保護され、 $3'$ -末端に結合した水酸基の水素原子が $CO\bar{R}^4$ 基で置換されたもの、のすべての保護基を除去することからなるものである。

一方、式[IV]の化合物は、他の官能基部分が保護されたオリゴスクレオチドの $5'$ -水酸基上での保護された一級アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

第1図は、この紹介した合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ（その意味ないし詳細は、後記した通りである）。

- R⁰ リン酸基を保護する置換基であって、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。
- R¹ 二価の保護または分枝鎖の炭化水素基である。
- R² アミノ基の保護基であって、通常ジメトキシトリアル基が用いられる。
- R³ 他のすべての保護基が安定な条件で容易に脱

式[IV]で示される化合物は、他の官能基部分が保護されたオリゴスクレオチドの $5'$ -水酸基上での保護された一級アミノ基の導入からなる合目的的な任意の方法によって合成することができる。

化合物[IV]の合成法をその一実施態様（第1図）について示せば、下記の通りである。第1図において、 $5'$ -水酸基化合物[0]にリン酸化剤（たとえば、ホスホジトリアゾリド、ホスホジクロリドまたはホスホベンゾトリアゾリド等）を作用させてリン酸化し、ついでアミノ基が保護されているアミノアルコール化合物[1]（この化合物はアミノアルキレンアルコール（ NH_2-R^1-OH ）のアミノ基を R^2 で保護することにより得ることができる）を結合させることにより化合物[II]を得る。

なお、化合物[0]はオリゴスクレオチドであって、通常のオリゴスクレオチド合成法で製造可能である。合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれぞれの固相法および液相法がある。

離されて、リン酸ジエステルを与えることができる置換基であって、通常シアノエチル基が用いられる。

CO \bar{R}^4 通常のオリゴスクレオチド合成法に用いられる $3'$ -水酸基の保護基である。具体的には、R⁴が低級アルキル基、アリール基（特に、フェニル基、またはメチル置換フェニル）、あるいは固相合成法の際に用いられる適当なスペーサーを持つ組合（ポリスチレン樹脂、ポリアミド樹脂）であるもの、がある。

R⁵ 5'-末端水酸基の保護基であって、通常メトキシトリアル基が用いられる。

m 0 または任意の自然数。

n 0 または任意の自然数。

D 塩基を示す。

B' 保護された塩基を示すが、通常はB'-ベンゾイルアデニン、N-インソブチリルグアニン、N'-ベンゾイルシトシンおよびチミン（すなわち保護不能）より選択される。

化合物[IV]の合成

一方、通常のオリゴスクレオチド合成法、好ましくは本発明者らの固相合成法（*Tetrahedron Letters* 1979, 3635(1979)、*Nucleic Acids Research* 8, 5473(1980)、*Nucleic Acids Research* 8, 5491(1980)、*Nucleic Acids Research* 8, 5507(1980)、*Nucleic Acids Research Symposium Series* 7, 281(1980)）に従って合成した化合物[0]の $5'$ -末端を水酸基化した化合物[III']と先に合成した化合物[II]とを結合剤を用いて結合させることにより化合物[IV]を得ることができる。結合剤としてはトリルクロリド、メシテレンスルホニルクロリド、メシテレンスルホニルテトラゾリドおよびメシテレンスルホニルニトロトリアゾリド等があるが、メシテレンスルホニルニトロトリアゾリドが好ましい。なお、反応条件等の詳細は後記実験例を参照されたい。

化合物[IV]の合成

化合物[IV]は、上記化合物[IV]の保護基をすべて除去することによって得ることができる。

保護基CO \bar{R}^4 基、リン酸トリエステル中のオルト

クロロフェニル基および過酸化物のアンモニウム、0.5 M のテトラメチルグアニジン-ビリジン-2-カルボアルドキシムのジオキサン-水 (9:1 (7/7)) 混液で処理後、アルカリ処理 (四アンモニア水) を行なうことより検出される。R² がトリフルオロアセチル基の場合に、アンモニア処理により元元が検出されるが、オルトニトロフェニルスルフェニル基である場合にはメルカプトニタノール処理が必須である。R² として他の保護基を用いた場合には、オリゴスクリオナド基が予定な条件で、さらに別の処理を加えることも可能である。なお、デオキシオリゴリボスクレオチドの合成法は既に各種のものが公知であって、保護基の種類およびその導入しない除去ならびに結合その他について上記以外の詳細は後述の化学合成に因する成書や総説たとえば「メクレオシド・メクレオチドの合成」(丸善 1977 年)、「核酸有機化学」(化学同人 1979 年)、「核酸」(朝倉書店 1979 年)、*Tetrahedron*, 34, 31 (1978)、有合化, 34, 723 (1978) および化学の領域, 33, 566 (1979) 等を

参照することができる。

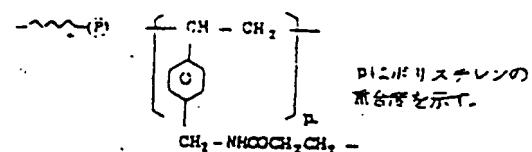
実験例

第 2 図のフローティートに従って、本品の化合物 (同図の化合物①) を調査した。

第 2 図で、記号に次の意味を持つ。

- ベンズイル化アデニン
- アデニン

DMTr ジメトキシトリル



R² オルトクロロフェニル

□ エチル

CE-シアノニアル

■ 2

—

□ 12

化合物 (V) (第 2 図の①) の合成

実験 1-1

ジメトキシトリルアデノシン/樹脂① (樹脂は粗体に過ぎないが、樹脂に保持された目的化合物に外観的には樹脂そのものと変わらないので、樹脂に保持された当該化合物を以下において單に樹脂と呼ぶことにする) 300 mg (0.033 mmol) をイソプロペノール-塩化メチレン (15:85, v/v) 混液 10 mL で 3 回洗浄、臭化亜鉛の 1.0 M のイソプロペノール-塩化メチレン溶液 8 mL で 5 分間ずつ (脱水反応 (脱ヒドロキシ化)) させて樹脂 (①) を得る。樹脂 (①) をイソプロペノール-塩化メチレン溶液 10 mL で 3 回洗浄し、これにジメトキシトリル (③) 150 mg (0.1 mmol) のビリジン溶液を添加後、共沸させて系を無水とし、メチレンスルホニルニトロトリアゾリド (以下 MSNT と記す) 150 mg (0.5 mmol) と無水ビリジン 2 mL を添加して 90 分間反応 (総合) させる。反応後、ビリジン 10 mL で 1 回洗浄し、柱洗浄 (約 10 mL) のジメチルアミノビリジン (以下 DMAP) を含む無水酢酸-ビリジン (1:9, (v/v)) 混液 10 mL を添加

し 10 分間反応させて示反応 S'-水酸基をアセチル化して保護し、これをビリジンで洗浄して、化合物 [④'] (n=2) を得る。以上のような操作を 5 回くり返して、化合物 [④] (n=12) を得る。

一方、S'-ヒドロキシ-ジメトキシトリル (⑤) 800 mg (0.71 mmol) とオルトクロロフェニルホスホジトリアゾリドとを著者のジオキサン溶液 (1.0 mmol, 6 mL) 中で 2 時間反応させ、洗いてトリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール 300 mg (1.4 mmol) および 1-メチル-1-イミダゾール 115 mg (1.4 mmol) を加えてさらに 2 時間反応させる。反応終了後、溶媒を飛去し、残渣をクロロホルムに溶解した後、水、0.5 M リン酸二水素ナトリウム水溶液、無水炭酸水素ナトリウム水溶液および 5% の塩化ナトリウム水溶液でそれぞれ洗浄し、無水酢酸ナトリウムで乾燥する。クロロホルム層を無水層、シリカゲルカラムで精製 (溶出液として 0~1% のメタノール含むクロロホルムを使用) し、溶出液を減圧後ベンゼン中に漏下し初東状の化合物 [⑥] を得る。

上級で合成した化合物④(2-12) 115 mg, (0.05 mmol) を前述と同様の方法で脱トリアル化したもの⑤に、化合物⑥ 60 mg (0.04 mmol) をトリニチルアミン-ビリジン-水(1:1:1, v/v) 溶液1mlで処理(脱シアノニカル化)した化合物⑦を加え、無水にしたのち、MSNT 50 mg (0.2 mmol) およびビリジン1mlを加え90分間反応(弱火)させ、反応終了後ビリジンおよびメタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護されたオリゴスクレオチド誘導体⑧を得る。

オリゴスクレオチド誘導体⑧ 15 mg を 0.5 M テトラメチルグアニジン-ビリジン-2-カルボアルドキシメイトのジオキサン-水(9:1, v/v) 溶液 200 μl を加え、遮光管中、室温で24時間反応させる。反応後、調アソニア水(2.5 ml)を加えて密閉し、50℃で一夜反応させる。反応終了後、戻すし、戻液を調理液、水に溶解させてからニテルで抽出を行なう。水層を調理液、セファデックス G-50 (φ1.5 × 120 cm, 滤出液は 0.05 M の高純度トリニチルアンモニウム緩衝液 pH 7.5) で

一の結果を第3-4、5-6および7-8 図に示す。これらの結果より、化合物⑨が生成していることがわかる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の化合物を合成する方法の一例を示すフローチャートである。

第2図は、実験例で示した本化合物のフローチャートである。

第3、5および7図は、化合物⑨(それぞれ実験例1-1、1-2および1-4)についてのセファデックス G-50での抽出パターンを示したものである。

第4、6および8図は、化合物⑨(それぞれ実験例1-1、1-2および1-4)についての高純度液クロマトグラフィーの抽出パターンを示したものである。

脱塩酸性ベンタデカアデニル酸誘導体⑨を得た。

また、同様の方法で実験1-2、1-3、1-4、1-5および1-6のオリゴスクレオチド誘導体を得た。実験例1-1～1-6の化合物の塩基配列その他の第1表に示す。

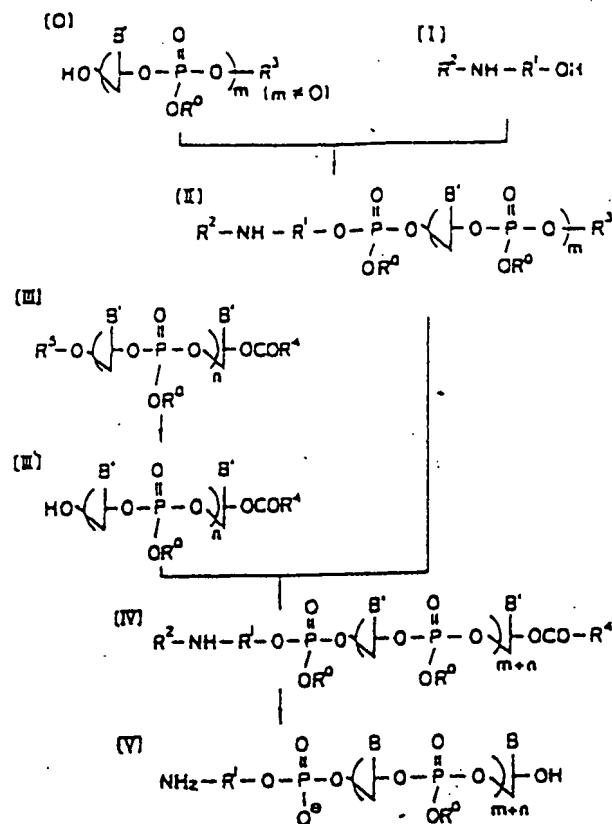
第1表

試験 誘導体 番号	化合物⑨の内容		
	$n + n'$	R^1	$(B)_{n+n'} S$
1-1	14	-C ₄ H ₉ -	AAAAA.....AAAAA.....
1-2	14	-C ₄ H ₉ -	TTTT.....TTTT.....
1-3	11	-C ₄ H ₉ -	AAAAA.....AAAAA.....
1-4	13	-C ₄ H ₉ -	TTGGGAAAGCTTCCC
1-5	16	-C ₄ H ₉ -	GGGAAGCTTCACGTTAA
1-6	16	-C ₄ H ₉ -	GGGTCGACTAACGCACT

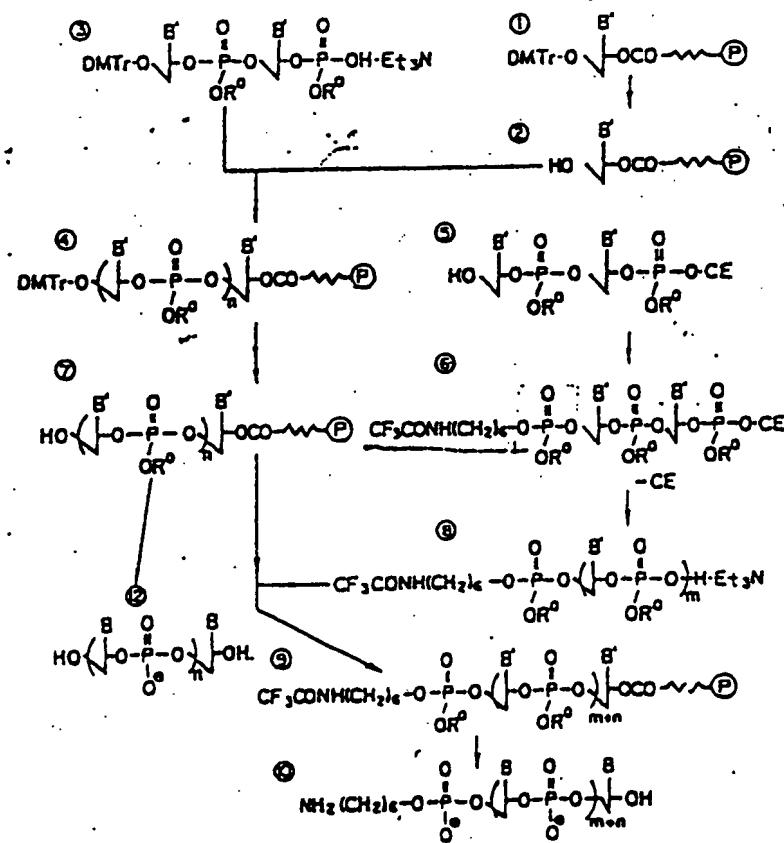
ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

実験例1-1、1-2および1-3についてのセファデックスおよび高純度液クロマトグラフィ

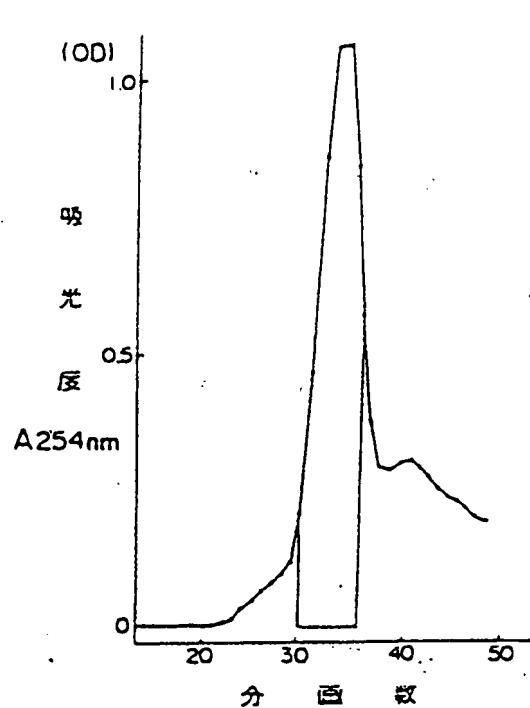
三一四



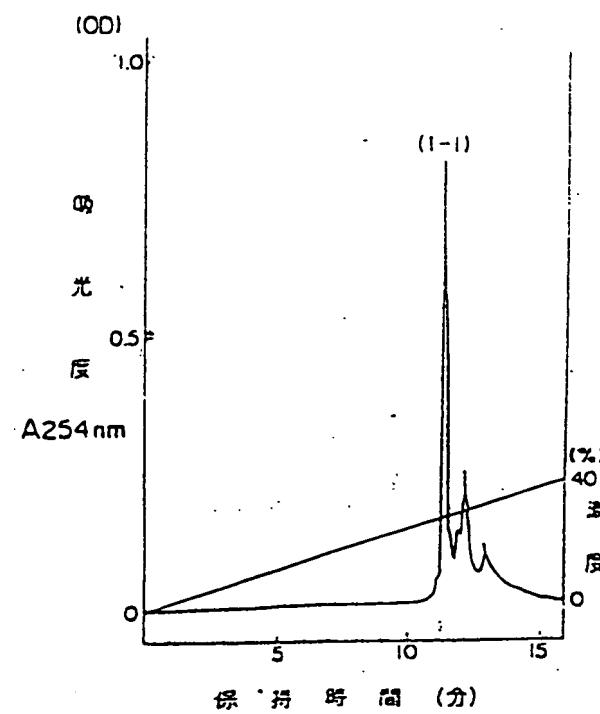
亮2圖



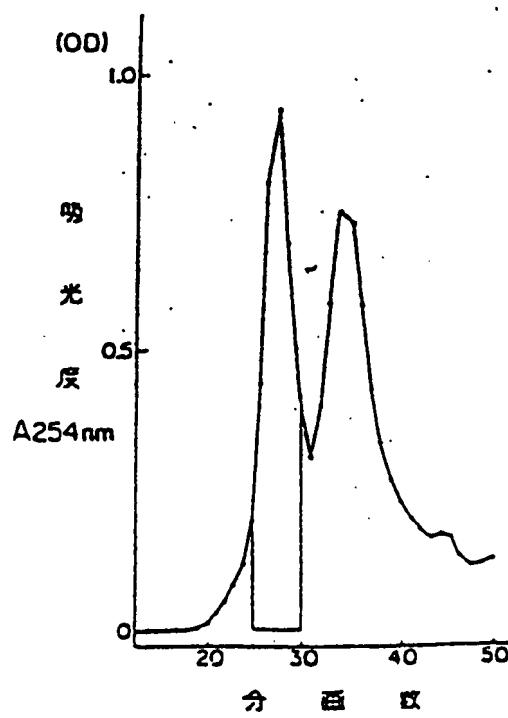
第3図



第4図



第5図



第6図

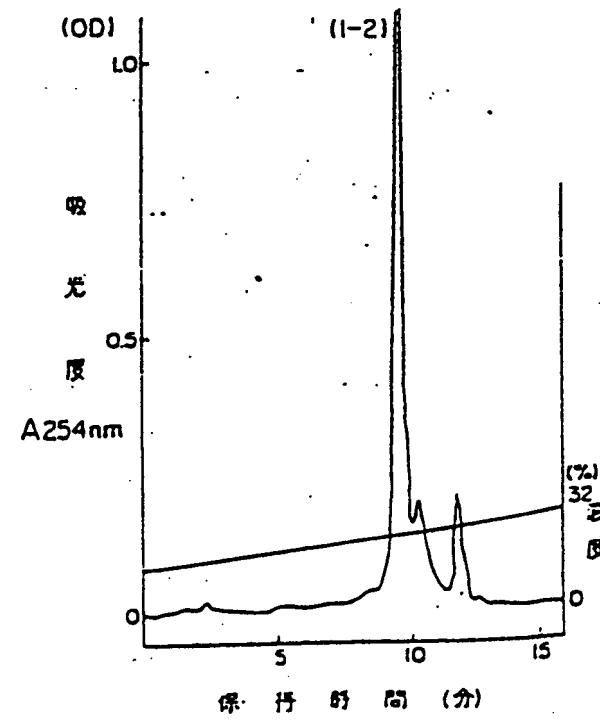


図7

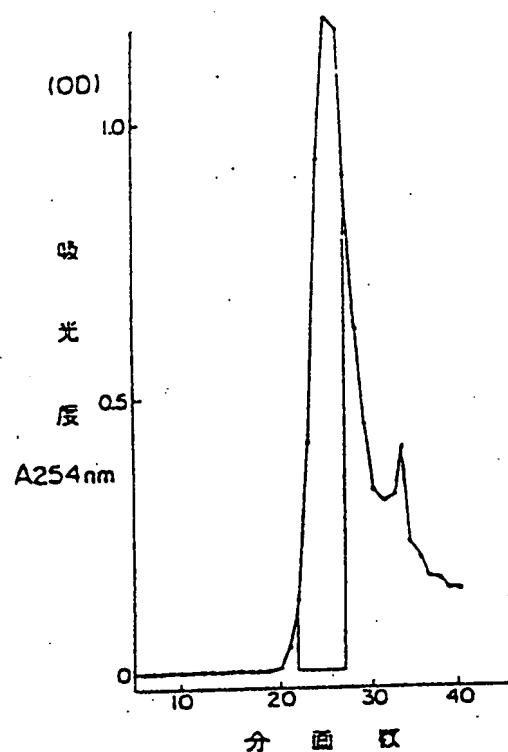


図8

